

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

PCT/PTO 18.02.2005

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Februar 2004 (05.02.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/010986 A1(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 31/00** (74) Anwälte: FORSTMAYER, Dietmar usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, 81541 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/008165

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Juli 2003 (24.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 33 737.3 24. Juli 2002 (24.07.2002) DE(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): MORPHOCHEM AKTIENGESELLSCHAFT FÜR KOMBINATORISCHE CHEMIE [DE/DE]; Gmunder Str. 37-37a, 81379 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): EILERS, Martin [DE/DE]; Hangstr. 22, 35039 Marburg (DE). BERWANGER, Bernd [DE/DE]; Bartüsser Str. 5, 35037 Marburg (DE). CHRISTIANSEN, Holger [DE/DE]; Wehracker 5, 35041 Marburg (DE). HARTMANN, Oliver [DE/DE]; Plockstr. 13, 35390 Giessen (DE). SCHÄFER, Helmut [DE/DE]; Schmalwiesenweg 4, 35041 Marburg (DE).(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2004/010986 A1(54) Title: USE OF MODULATORS OF THE SIGNAL TRANSDUCTION PATH USING THE PROTEIN KINASE FYN FOR THE TREATMENT OF TUMOROUS DISEASES

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON MODULATOREN DES SIGNALTRANSDUKTIONSWEGS ÜBER DIE PROTEIN-KINASE FYN ZUR BEHANDLUNG VON TUMORERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The use of modulators of the signal transduction path using the protein kinase Fyn (such as Rho-kinase inhibitors or inhibitors of the protein kinase Csk, for example) for the treatment of tumorous diseases, in particular for the therapy of neuroblastomas is disclosed.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung von Modulatoren des Signaltransduktionswegs über die Proteinkinase Fyn (wie z. B. Rho-Kinase Inhibitoren oder Inhibitoren der Proteinkinase CSK) zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere zur Therapie von Neuroblastom.

Verwendung von Modulatoren des Signaltransduktionswegs über die Proteinkinase Fyn zur Behandlung von Tumorerkrankungen

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung von Mo-

5 dulatoren des Signaltransduktionswegs über die Proteinkinase Fyn (wie z. B. Rho-Kinase Inhibitoren) zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere zur Therapie von Neuroblastomen.

10 Neuroblastome sind bösartige Krebserkrankungen des peripheren sympathischen Nervensystems, die im Kindesalter auftreten. Sie sind eine der häufigsten bösartigen Krebserkrankungen im Kindesalter. Bundesweit erkranken jährlich ca. 150-200 Kinder an diesem Tumor, der in fortgeschrittenen Stadien 15 weitgehend unheilbar ist. Der Verlauf der Krankheit ist je nach Einzelfall unterschiedlich und reicht von einer spontanen Rückbildung bis zum progressiven Verlauf und zur Bildung von Metastasen. Der Tumor entwickelt sich aus Vorläuferzellen des autonomen Nervensystems, welches die unwillkürlichen Funktionen, wie Herz- und Kreislauf, Darm- und Blasentätigkeit, steuert. Es sterben insgesamt ca. 40 % der 20 erkrankten Kinder innerhalb der ersten fünf Jahre.

Ein genetisches Kriterium, das als Begründung für eine ungünstige Prognose dient, ist die Amplifikation des MYCN-Gens, die zur deregulierten Expression des N-Myc Proteins im Tumorgewebe führt. N-myc ist ein Transkriptionsfaktor, der die Genexpression sowohl positiv als auch negativ kontrollieren kann. Anhand eines Zellkultur-Modells wurde gezeigt,

- 2 -

daß Myc-Proteine sowohl das Zellwachstum als auch die Zellproliferation regulieren.

Derzeitige klinische Untersuchungen ziehen für eine Prognose
5 des Neuroblastoms drei Kriterien heran:
das Stadium des Tumors, das Alter des Patienten und die
Amplifikation des MYCN-Gens. Die Amplifikation des MYCN-Gens
ist jedoch kein verlässliches Kriterium, da auch Tumore sich
entwickeln können, die kein amplifiziertes MYCN-Gen
10 aufweisen.

Demgegenüber ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ge-
netische Unterschiede in denjenigen Signaltransduktionswegen
, welche die Proliferation und Differenzierung des Neu-
15 roblastoms kontrollieren, zur Prognose und Therapie von Tu-
morerkrankungen, insbesondere des Neuroblastoms, zu nutzen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, neue Methoden zur
Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere des Neurobla-
20 stoms, bereitzustellen.

Mittels einer Microarray-Analyse wird parallel die Express-
sion einer großen Zahl von Genen in einer beliebigen Zahl
von Proben von vielen Patienten, die alle an einem Neuro-
blastom erkrankt sind, gemessen. Anschließend erfolgt eine
25 statistische Analyse, in der klinische Parameter mit den Ex-
pressionsdaten korreliert werden und somit Gene identifi-
ziert werden, die kausal am Tumorverlauf beteiligt sind.
Durch Identifikation der Gene, die kausal am Tumorverlauf

beteiligt sind, eröffnen wir die Möglichkeit einer kausalen Therapie der Erkrankung.

Die Expression der aufgefundenen Gene korreliert mit spezifischen Tumorstadien. Überraschenderweise gehört ein Großteil dieser Gene zu einem Signaltransduktionsweg, der über die Proteinkinase Fyn verläuft. Von diesem Signaltransduktionsweg ist bekannt, daß er in Zellkulturen Zelladhäsion, Zellproliferation und Differenzierung reguliert. Änderung in der Zelladhäsion sind für die Bildung von Metastasen verantwortlich, Zelldifferenzierung und -proliferation kontrollieren das eigentliche Tumorwachstum. Es wird gezeigt, daß die Daten durch unabhängige Meßmethoden validiert werden können. Mittels Westernblotverfahren wurde gezeigt, daß ein Zusammenhang zwischen der Aktivität bzw. der Expression der Fyn-Kinase und dem Stadium des Tumors besteht. Alle Messungen zeigen, daß die Signaltransduktion durch Fyn in fortgeschrittenen Tumorstadien abgeschaltet wird. Dabei unterstreichen die Expressionsanalysen die Rolle des Fyn-Signaltransduktionsweges für die Bildung von Metastasen.

Darüber hinaus weisen wir nach, daß Fyn eine kausale Rolle in den genannten Prozessen im Neuroblastom hat. Anhand zweier verschiedener Zelllinien aus dem Neuroblastom wird gezeigt, daß die Expression von Fyn, also die Reaktivierung der Signaltransduktion zu einem Wachstumsarrest, zu erhöhter Adhesion und zur Differenzierung von Neuroblastomzellen in Kultur führt. Damit haben wir nachgewiesen, daß der Verlust der Signaltransduktion durch Fyn ursächlich für die genannten biologischen Prozesse ist.

Mit Hilfe einer Microarray-Analyse humaner Tumorproben aus dem Neuroblastom wurde überraschend gefunden, dass der Signaltransduktionsweg über die Proteinkinase Fyn das Tumorwachstum sowie die Bildung von Metastasen reguliert. Des weiteren wurde gefunden, dass die Signaltransduktion durch Fyn im fortgeschrittenem Tumorstadium abgeschaltet wird. Die Beeinflussung des Signaltransduktionsweges via Fyn Kinase, insbesondere die (Re-)Aktivierung des im Neuroblastom herunter regulierten Signaltransduktionsweges via Fyn stellt eine Therapiemöglichkeit für die Behandlung von Neuroblastomen dar.

Durch den Einsatz von Modulatoren des Signaltransduktionswegs über die Proteinkinase Fyn ist es erfundungsgemäss möglich, das Tumorwachstum sowie die Bildung von Metastasen zu unterbinden, und damit Tumorerkrankungen (insbesondere Neuroblastom) zu behandeln.

- 20 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren des Signaltransduktionsweges über die Proteinkinase Fyn, wobei die Modulatoren Inhibitoren von Enzymen sind, die direkt oder indirekt durch aktives Fyn inhibiert werden.
- 25 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren, die zu einer Erhöhung der Fyn-Aktivität in den Tumorzellen führen.

30 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren, wobei die Modulatoren Inhibitoren der Proteinkinase

- 5 -

CSK, Inhibitoren der Rho-Kinase, Inhibitoren der MAP-Phosphatase oder Aktivatoren der Protein Kinase C sind.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren, die den proteolytischen Abbau von Fyn-Kinase in vivo hemmen.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren, wobei die Modulatoren Inhibitoren von Phosphatasen sind, die Fyn entgegenwirken.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren, die zu einer Erhöhung der Signaltransduktion durch Fyn beitragen.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung die Verwendung von Modulatoren des Signaltransduktionsweges via Proteinkinase Fyn zur Herstellung eines Medikaments zur Unterdrückung der Metastasenbildung von Tumoren im Frühstadium, wobei der Tumor ein pädiatrischer oder ein adulter Tumor sein kann.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Modulatoren wie oben beschrieben als Bestandteil einer pharmazeutischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung neben dem Modulator als Wirkstoff gegebenenfalls Trägerstoffe und/oder Adjuvantien umfaßt.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren wie oben beschrieben, dadurch gekennzeichnet, daß der Modulator in Form eines pharmakologisch akzeptablen Salzes,

- 6 -

Solvates, Hydrates, oder einer pharmakologisch akzeptablen Formulierung vorliegt.

- Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren wie oben beschrieben, dadurch gekennzeichnet, daß der Modulator als Prodrug vorliegt, umfassend den Modulator und mindestens eine pharmakologisch akzeptable Schutzgruppe, die unter physiologischen Bedingungen abgespalten wird.
- 10 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Modulatoren wie oben beschrieben, dadurch gekennzeichnet, daß der Modulator oral, parenteral, rektal, durch Inhalation, transdermal oder intranasal verabreicht wird.

15

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Eine korrespondierende wissenschaftliche Arbeit zu diesem Thema wurde veröffentlicht von B. Berwanger, O. Hartmann, E. Bergmann, S. Bernard, D. Nielsen, M. Krause, A. Kartal, D. Flynn, R. Wiedemeyer, M. Schwab, H. Schäfer, H. Christiansen und M. Eilers: "Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma" in Cancer Cell, Vol. 2, November 2002, Seite 377-386, auf die vollinhaltlich Bezug genommen wird.

25

Um eine Einsicht in die molekulare Abfolge der Entwicklung von Neuroblastomen zu erhalten, wurden Expressionsprofile von 94 individuellen Tumor-Gewebeproben erstellt, wobei ein humaner, unigener 4608-cDNA-Chip verwendet wird. Jeder Chip wird mit cDNA als Referenz hybridisiert, die sich von einer

humanen Neuroblastom-Zelllinie (SHEP) ableitet. Die Tumoren wurden dahingehend ausgewählt, daß sie die Verteilung der Tumorstadien und die MYCN-Amplifikation der gesamten Tumorkbank widerspiegeln. Um Vergleiche zwischen den einzelnen

5 Spots und den Arrays zu ermöglichen, wurde jedes Signal in bezug auf seinen Hintergrund korrigiert, und die \log_2 -transformierten Ein/Aus-Regulations-Intensitätsverhältnisse wurden berechnet und standardisiert. Eine t-Statistik mit zwei Proben und angepaßten p-Werten wurde verwendet, um unterschiedlich exprimierte Gene zu identifizieren (Callow et al., 2000). Die angepaßten p-Werte korrigieren gleichzeitig das Testen von 4608 Genen, und schätzen die Gesamtwahrscheinlichkeit für den Nachweis eines falschen Gens ab (siehe Methoden).

15 Wir fanden 123 unterschiedlich exprimierte Gene, als wir MYCN-amplifizierte ($n = 17$) und nichtamplifizierte ($n = 77$) Tumore verglichen (angepaßter p-Wert $< 0,05$). Diese Gene wurden in einem unkontrollierten, hierarchischen Cluster verwendet, und die Analyse zeigte, daß alle Tumore mit Ausnahme von dreien in korrekter Weise einer der beiden Klassen zugeordnet wurden. Eine funktionelle Zuschreibung zeigte, daß die meisten Gene, die in MYCN-amplifizierten Tumoren eingeschaltet waren, für Proteine codieren, die eine Rolle 20 in der Proteinsynthese, im Stoffwechsel und in der Regulation des Zellzyklus spielen; dies stimmt mit den Mikroarray-Daten überein, die sich durch Verwendung induzierbarer Systeme in Zellkultur ergaben. Diese Ergebnisse zeigen, daß Myc-Proteine sowohl das Zellwachstum, als auch 25 die Zell-Proliferation regulieren, und daß die anhand der 30

Zellkultur entwickelten Modelle sich auf die Entstehung des Neuroblastoms erstrecken. Die Expression einer Reihe von Genen, welche als Zielgene von (c-)Myc in Zellkultur-Experimenten identifiziert wurden, war in bezeichnender Weise bezüglich beider Klassen von Tumoren verschieden. Eine große Gruppe von Genen, die meist in MYCN-amplifizierten Tumoren abgeschaltet waren, codieren für Proteine, die in vielstufigen Signaltransduktionswegen involviert sind. Dies zeigt, daß Myc-Proteine ein negatives Rückkopplungssignal für Signaltransduktionswege darstellen. Überraschenderweise codieren die Zellzyklus-Gene, die in MYCN-amplifizierten Tumoren verstärkt auftreten, für Proteine, die dafür bekannt sind, daß sie als Reaktion an einem Kontrollpunkt (checkpoint response), oder in der G2- oder M-Phase des Zyklus fungieren, was auf eine neue Funktion von Myc bei der Kontrolle und im späten Zellzyklus hindeutet.

Die Deregulierung dieser Gene kann in einfacher Weise das fortgeschrittene Tumorstadium der meisten MYCN-amplifizierten Tumore widerspiegeln (Tabelle 1). Um diese Möglichkeit auszuschließen, haben wir ihre Expression zwischen dem Stadium 4 der MYCN-amplifizierten und der nichtamplifizierten Tumore verglichen. Die Expression aller von uns analysierten Gene wurde durch MYCN-Amplifikation reguliert, unabhängig vom Tumorstadium. Umgekehrt könnte die Deregulation eine direkte Regulation durch N-Myc widerspiegeln. Mit dieser Vorstellung stimmt überein, daß vielfache E-Boxen im Promotor und den Introns der MAD2, CENPE und AURORA2-Gene vorhanden sind (Figur 1, Feld e). Tatsächlich zeigte die Chromatin-Immunpräzipitation, daß N-Myc *in vivo* an die E-

- 9 -

Boxen der MAD2-Gene gebunden ist. Wir haben daraus geschlossen, daß mindestens einige der von uns identifizierten Gene direkte Zielgene von N-Myc sind.

5 Tabelle 1

| | | STADIUM | | | | | Summe |
|--------------|-----------------------------|---------|------|------|------|-----|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 4S | |
| MYCN | Nicht-amplifizierte | 19 | 8 | 17 | 21 | 12 | 77 |
| | amplifizierte | 1 | 1 | 4 | 8 | 3 | 17 |
| Alter | < 12 Monate | 18 | 1 | 11 | 5 | 15 | 50 |
| | > 12 Monate | 2 | 8 | 10 | 24 | 0 | 44 |
| Alter | Mittelwert (Monate) | 4.3 | 23.4 | 28.7 | 42.6 | 4.0 | 23.3 |
| | Standradabweichung (Monate) | 4.2 | 17.8 | 41.1 | 33.6 | 3.4 | 31.6 |
| Summe | | 20 | 9 | 21 | 29 | 15 | 94 |

10 Tabelle 1: Klinische Parameter von 94 Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben. Alter und Stadium sind stark durcheinandergebracht, und aufgrund der geringen Zahl konnten sie nicht unabhängig analysiert werden.

Eine anfängliche Analyse ergab, daß von den nicht-MYCN-amplifizierten Tumoren die Stadien 1 und 4, nicht jedoch die 15 Stadien 2, 3 und 4S, Unterschiede in ihren Expressionsprofilen zeigen (Daten nicht gezeigt). Wir fanden 36 bezeichnende Gene, die in Tumoren im Stadium 1 ($n = 19$) und im Stadium 4 ($n = 21$) unterschiedlich exprimiert waren (angepaßter p-Wert $< 0,2$). Dieser Satz von Genen zeigte eine geringe 20 Überlappung mit der Gruppe von Genen, welche MYCN-amplifizierte von nichtamplifizierten Tumoren unterscheidet; eine funktionelle Zuschreibung der Gene ergab, daß die Gene, welche für Proteine codieren, die im Stoffwechsel und der

- 10 -

Proteinsynthese eine Rolle spielen, von der Gruppe der Stadium-spezifischen Gene scheinbar abwesend waren, im Gegensatz zu den Genen, die für MYCN-amplifizierte Tumore charakteristisch waren. Im Gegensatz dazu codiert ein charakteristischer Prozentsatz von Genen, die unterschiedlich exprimiert waren, für Gene, die in die Signalübertragung durch die Non-Rezeptor Tyrosin-Kinase Fyn und das Actin Cytoskeleton involviert sind; diese Gene waren in koordinierter Weise im fortgeschrittenen Stadium des Neuroblastoms herabreguliert. Diese Gruppe umfaßt Fyn selbst, das Actin-Filament-Bindeprotein (AFAP), ein Protein, das an Src und Fyn-Kinase bindet und diese aktiviert; α -Catenin (CTNNA1), ein actin-bindendes Protein, dessen Bindung an β - und γ -Catenin durch Fyn-abhängige Phosphorylierung reguliert wird; das neurale Zell-Adhäsionsprotein NRCAM, welches durch Non-Rezeptor Tyrosin-Kinasen und die actin-bindenden Proteine Tropomodulin und MARCKS signalisiert.

Der Westernblot bestätigte die verminderte Expression von Fyn in Tumoren des Stadiums 4, im Vergleich zum Stadium 1; zusätzlich ergab das Experiment in übereinstimmender Weise eine langsamere Wanderung des Fyn-Proteins in Extrakten aus allen Tumoren des Stadiums 1, verglichen mit denen des Stadiums 4, was zeigt, daß die autophosphorylierte (aktive) Form vorliegt. Phosphatasebehandlung bestätigte, daß die unterschiedliche Wanderung aufgrund der Phosphorylierung zustandekam. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde eine hohe Fyn-Kinaseaktivität in Gewebeproben aus Tumoren des Stadiums 1 übereinstimmend erhalten, wobei Immunkomplex Kinase-Assays verwendet wurden, die sowohl die Au-

- 11 -

tophosphorylierung als auch die Phosphorylierung des exogenen Substrats, Enolase (Wolf et al., 2001) messen. Im Gegensatz dazu war die Fyn-Kinaseaktivität in Extrakten aus Tumoren des Stadiums 4 variabel und im Durchschnitt wesentlich niedriger.

Um zu testen, ob Fyn eine Rolle in der Differenzierung und Regulation der Zell-Proliferation von Neuroblastomzellen spielt, verwendeten wir eine vorübergehende Transfektion, um 10 Fyn in SH-SY5Y-Zellen zu exprimieren - eine humane Neuroblastom-Zelllinie, die sich aus einem Tumor im Stadium 4 ableitet (Pahlman et al., 1981). Die Expression von Wild-Typ Fyn induzierte die Ausbildung von vielfachen Neuriten und offenkundigen morphologischen Charakteristika der Differenzierung. Eine Färbung mit Antikörpern, die gegen Cyclin A 15 als ein Markerprotein der Zell-Proliferation gerichtet sind, ergab, daß die Zellen, welche aktives Fyn exprimierten, aus dem Zellzyklus ausgestiegen waren. Zellen, die eine kinase-negative Allele (FynK299M) exprimierten, zeigten im Gegen- 20 satz dazu keine Zeichen von morphologischer Differenzierung. Übereinstimmend mit der Rolle von AFAP bei der Aktivierung von Fyn induzierte die Expression einer konstitutiv aktiven Allele von AFAP morphologische Veränderungen, die stark an aktives Fyn erinnern, während eine dominant-negative Allele 25 von AFAP die Differenzierung nicht beeinflußt.

Wir wiederholten die Experimente in IMR-32-Zellen, einer humanen Neuroblastom-Zelllinie, die ein amplifiziertes MYCN-Gen trägt (Clementi et al., 1986). Ähnlich den in SH-SY5Y-Zellen 30 erhaltenen Ergebnissen induzierte die Expression der aktiven

- 12 -

Fyn-Kinase eine Neuritenausbildung und einen Ausstieg aus dem Zellzyklus. Dies zeigt, daß die Induktion der Differenzierung durch Fyn auch in Gegenwart eines amplifizierten MYCN-Gens stattfindet. Dies stimmt mit dem Befund 5 überein, daß die Expression von FYN, AFAP, NRCAM und CTNNAL gleichermaßen in MYCN-amplifizierten ebenso wie in nicht-amplifizierten Tumoren, in bezug auf Tumore im Stadium 1, herabreguliert ist.

10 Insgesamt identifizierten wir zwei genetische Programme, welche die Entwicklung von Neuroblastomen regulieren, eines, welches durch die Amplifikation des MYCN-Gens kontrolliert wird, und ein zweites, stadium-spezifisches Programm der Genexpression. Beide Programme sind in hohem Maße unabhängig 15 voneinander, da (a) beide Gruppen von Genen geringe Überlappung zeigen, (b) die Gene durch die MYCN-Amplifikation herabreguliert sind, unabhängig vom Tumorstadium, und (c) die Tumorstadium-spezifischen Gene herabreguliert sind, unabhängig von der MYCN-Amplifikation. Die deregulierte Expression 20 von MYCN aktiviert Gene, die für Proteine codieren, welche sowohl am Fortschreiten des Zellzyklus als auch am Zellwachstum beteiligt sind, und unterdrückt Gene, welche für Proteine codieren, die in vielstufige Signalprozesse in einem menschlichen Tumor involviert sind. Diese Befunde 25 zeigen spezifisch, daß Myc-Proteine die Genexpression in der G2-Phase des Zellzyklus kontrollieren, und Gene aktivieren, die in Kontrollpunkt-Prozessen (checkpoint processes) involviert sind.

- 13 -

Unsere Daten zeigen, daß die Fyn-Kinase die Proliferation und die Differenzierung von Neuroblastomzellen *in vivo* reguliert; dies wird ebenso durch den Befund unterstützt, daß das Stadium-spezifische Expressionsprofil ein Überleben
5 vorhersagt. Detaillierte Expressionsprofile von individuellen Tumorstadien ergaben, daß die Herabregulierung von Fyn am auffälligsten zwischen den Stadien 1 und 2 ist, welche mit der Bildung von Metastasen in den lokalen Lymphknoten korreliert. Die Herabregulation von Fyn und ebenso die
10 veränderte Zelladhäsion steuern die Bildung von lokalen Metastasen *in vivo*.

Aktives Fyn kann seine Funktion auf mehrere Arten ausüben: In neuronalen Zellen phosphorylieren Non-Rezeptor Tyrosin-
15 Kinasen Rho-GAP, was zur Inaktivierung von Rho und der Induktion der Differenzierung führt. Es wurde gefunden, daß es Moleküle in Signalübertragungswegen gibt, welche durch Fyn-Signalisierung inhibiert werden, was sie zu Kandidaten für einen therapeutischen Eingriff macht. Die Beeinflussung des
20 Signalübertragungsweges abwärts von Fyn stellt erfindungsgemäß einen therapeutischen Zugang für Neuroblastome im fortgeschrittenen Stadium bereit.

Bevorzugte Zielmoleküle im Fyn-Signaltransduktionsweg sind
25 dabei solche, die durch Fyn Signaltransduktion inhibiert werden.

Bevorzugte Modulatoren sind Inhibitoren von Enzymen, die direkt oder indirekt durch aktives Fyn inhibiert werden.

Weiter bevorzugt sind Modulatoren, die zu einer Erhöhung der Fyn-Aktivität in Tumorzellen (bevorzugt in Neuroblastomen) führen.

- 5 Besonders bevorzugt sind Inhibitoren der Proteinkinase CSK, die in Neuroblastomen exprimiert wird und in vivo ein negativer Regulator von Fyn ist.

Des weiteren bevorzugt sind Modulatoren, die den proteolytischen Abbau von Fyn-Kinase in vivo hemmen wie z. B. generelle Inhibitoren des Proteasoms (LLNL, MG132) oder spezifische Inhibitoren der beteiligten E3-Ligasen.

10 Weiter bevorzugte Modulatoren sind Inhibitoren von Phosphatasen, die Fyn entgegenwirken wie z. B. MAP-Kinase Phosphatase 1.

15 Wiederum bevorzugt sind Modulatoren, die zu einer Erhöhung der Signaltransduktion durch Fyn beitragen wie z. B. Rho Kinase Inhibitoren, MAP Phosphatase Inhibitoren oder Aktivatoren der Proteinkinase C.

20 Des weiteren sind von der vorliegenden Erfindung auch pharmakologisch akzeptable Salze, Solvate, Hydrate oder pharmakologisch akzeptable Formulierungen der beschriebenen Modulatoren umfasst.

25 Beispiele für pharmakologisch akzeptable Salze sind Salze von physiologisch akzeptablen Mineralsäuren wie Salzsäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure oder Salze von organischen

- 15 -

Säuren wie Methansulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Milchsäure, Essigsäure, Trifluoressigsäure, Zitronensäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure und Salicylsäure.

Die erfindungsgemässen Modulatoren können solvatisiert,

- 5 insbesondere hydratisiert sein. Die Hydratisierung kann z.B. während des Herstellungsverfahrens oder als Folge der hygrokopischen Natur der anfänglich wasserfreien Verbindungen auftreten. Wenn die beschriebenen Modulatoren asymmetrische C-Atome enthalten, können sie entweder als
10 Diastereomeren-Gemische, Gemische von Enantiomeren oder als optisch reine Verbindungen vorliegen.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten mindestens einen der beschriebenen

- 15 Modulatoren als Wirkstoff und fakultativ Trägerstoffe und/oder Adjuvantien.

Die Pro-Drugs, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Er-

- 20 findung sind, bestehen aus einem erfindungsgemässen Modulator und mindestens einer pharmakologisch akzeptablen Schutzgruppe, die unter physiologischen Bedingungen abgespalten wird, z.B. einer Alkoxy-, Aralkyloxy-, Acyl- oder Acyloxy-Gruppe, wie z.B. einer Ethoxy-, Benzyloxy-, Acetyl-
25 oder Acetyloxy-Gruppe.

- Auch die Verwendung der Modulatoren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Tumorerkrankungen (insbesondere Neuroblastom) ist Gegenstand der
30 vorliegenden Erfindung. Im allgemeinen werden die Modulatoren unter Anwendung der bekannten und akzeptablen Modi,

entweder einzeln oder in Kombination mit einem beliebigen anderen therapeutischen Mittel verabreicht. Solche therapeutisch nützlichen Mittel können auf einem der folgenden Wege verabreicht werden: oral, z.B. als Dragees, überzogene
5 Tabletten, Pillen, Halbfeststoffe, weiche oder harte Kapseln, Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen; parenteral, z.B. als injizierbare Lösung; rektal als Suppositorien; durch Inhalation, z.B. als Pulverformulierung oder Spray, transdermal oder intranasal. Zur Herstellung solcher Ta-
10 bletten, Pillen, Halbfeststoffe, überzogenen Tabletten, Dragees und harten Gelatinekapseln kann das therapeutisch verwendbare Produkt mit pharmakologisch inerten, anorganischen oder organischen Arzneimittelträgersubstanzen ver-
mischt werden, z.B. mit Lactose, Sucrose, Glucose, Gelatine,
15 Malz, Silicagel, Stärke oder Derivaten derselben, Talkum, Stearinsäure oder ihren Salzen, Trockenmagermilch und dgl. Zur Herstellung von weichen Kapseln kann man Arzneimittel-
trägerstoffe wie z.B. pflanzliche Öle, Petroleum, tierische oder synthetische Öle, Wachse, Fette, Polyole einsetzen. Zur
20 Herstellung von flüssigen Lösungen und Sirups kann man Arz-
neimittelträgerstoffe wie z.B. Wasser, Alkohole, wäßrige Salzlösung, wäßrige Dextrose, Polyole, Glycerin, pflanzliche Öle, Petroleum, tierische oder synthetische Öle verwenden.
Für Suppositorien kann man Arzneimittelträgerstoffe wie z.B.
25 pflanzliche Öle, Petroleum, tierische oder synthetische Öle, Wachs, Fett und Polyole verwenden. Für Aerosol-
Formulierungen kann man komprimierte Gase, die für diesen Zweck geeignet sind, wie z.B. Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid einsetzen. Die pharmazeutisch verwendbaren
30 Mittel können auch Zusatzstoffe zur Konservierung, Stabi-

- 17 -

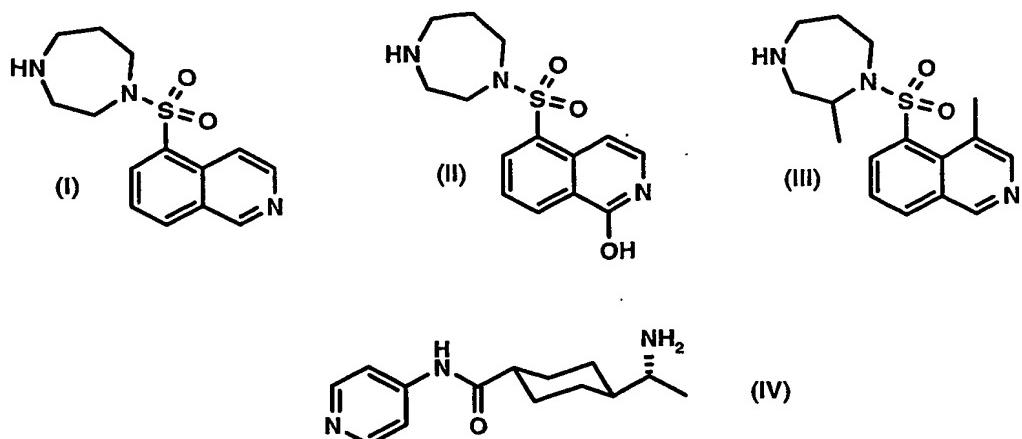
lisierung, Emulgatoren, Süßstoffe, Aromastoffe, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer, Umhüllungszusatzstoffe und Antioxidantien enthalten.

- 5 Kombinationen mit anderen therapeutischen Mitteln können andere Wirkstoffe beinhalten, die gewöhnlich zur Behandlung von Tumorerkrankungen (insbesondere Neuroblastom) eingesetzt werden.
- 10 Zur Vorbeugung und/oder Behandlung der oben beschriebenen Erkrankungen kann die Dosis der erfindungsgemäßen Modulatoren innerhalb breiter Grenzen variieren und kann auf den individuellen Bedarf eingestellt werden. Im allgemeinen ist eine Dosis von 0,1 µg bis 100 mg/kg Körpergewicht pro Tag
- 15 geeignet, wobei eine bevorzugte Dosis 0,5 bis 10 mg/kg pro Tag ist. In geeigneten Fällen kann die Dosis auch unter oder über den oben angegebenen Werten liegen.

Beispiele

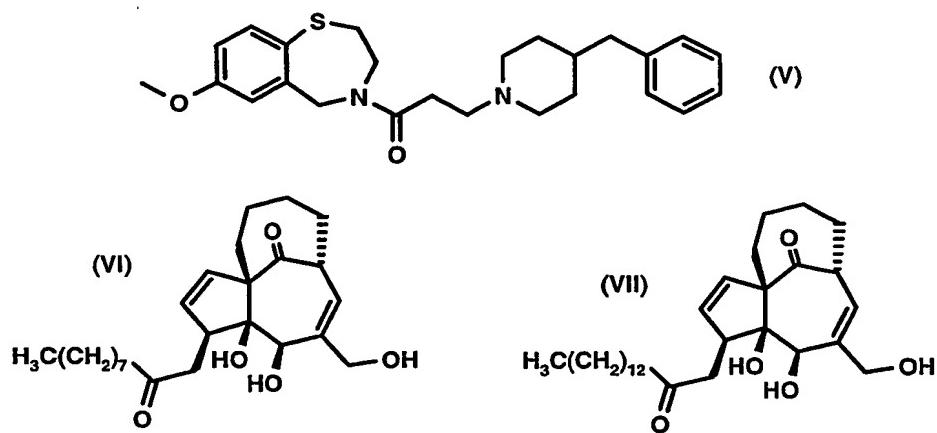
- 20 Beispiele für Rho Kinase Inhibitoren sind in EP0370498, US4997834, EP0956865, US6218410, US4678783, US6153608, EP0885888, WO0168607 und WO0156988 beschrieben. Konkret seien hier Verbindungen **I** (Fasudil), **II** (Hydroxyfasudil),
25 **III** und **IV** genannt:

- 18 -



Beispiele für Aktivatoren von Proteinkinase C sind Verbindung V, die Verbindung EP-70905 von Europeptides, die Naturstoffe Bryostatin, Teleocidin, Aplysiatoxin sowie Ester von Phorbol und Ingenol. Weitere Verbindungen wie VI und VII sind in J. D. Winkler et al. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 296-300 beschrieben.

10



- 19 -

Ein Beispiel für einen MAP Kinase Phosphatase 1 Inhibitor ist die Verbindung MX 7091 von Maxima Pharmaceuticals.

Ein Beispiel für einen CSK Inhibitor ist der Naturstoff
5 Staurosporin.

Material und Methoden

10 Microarray-Experimente

Der verwendete Chip enthält den cDNA-Satz gf200 von Research Genetics (<http://www.resgen.com>), sowie 100 cDNA zusätzlich, die bereits vorher als potentiell für eine Prognose der
15 Neuroblastom-Entwicklung geeignet beschrieben wurden (für Einzelheiten siehe <http://www.imt.uni-marburg.de>). Jede cDNA wurde zweimal pro Chip aufgetragen. Die Chips wurden wie in Hegde et al., 2000 beschrieben hergestellt, unter Verwendung eines GMS 417 Arrayer.

20

Eine anfängliche histochemische Untersuchung einer Reihe von 100 willkürlich ausgewählten Tumoren ergab, daß annähernd 95% der Tumore weniger als 5% Zellen in den Gewebeproben enthielten, die keine Tumorzellen waren (siehe Bergmann et
25 al., 2001). Daher wurde kein weiterer Versuch unternommen, das Tumorgewebe vor der Präparation der RNA zu sezieren. Die gesamte RNA aus dem Neuroblastomgewebe und dem SHEP wurde unter Verwendung eines Qiagen RNA Isolationskits entsprechend der Anleitung des Herstellers isoliert. 40 µg Gesamt-
30 RNA wurde verwendet um Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkierte

- 20 -

cDNA entsprechend dem veröffentlichten Protokoll herzustellen (<http://brownlab.stanford.edu>). Die Chips wurden unter Verwendung eines GMS 418 Fluoreszenz-Scanners gescannt, und die Bilder wurden unter Verwendung der IMAGENE 3.0 Software analysiert. Die Expressionsdaten wurden entweder durch Northern Blot-Analyse oder durch Real Time RT-PCR Assays bestätigt.

Standardisierung und Qualitätskontrolle

10 ImaGene 3.0: Die Softwareparameter wie "Signalbereiche" oder "Spotnachweis-Schwelle" (siehe Benutzerhandbuch von ImaGene für Einzelheiten) wurden vor der Bildanalyse unseres Experimentes auf eine maximale Reproduzierbarkeit optimiert. Für jeden Spot werden das mittlere Signal und die Hintergrund-
15 Intensitäten für beide Kanäle erhalten. Um die Unterschiede der Spots zu bestimmen, wurde das korrigierte Hintergrundverhältnis der beiden Kanäle berechnet, und log₂-transformiert.
Um die Fluoreszenz-Intensitäten der beiden Farbstoffe auszu-
20 gleichen, sowie um einen Vergleich des Expressionsniveaus in Kreuzexperimenten zu ermöglichen, wurden die Rohdaten standardisiert. Zunächst benutzten wir eine nadelweise (pin-wise) intensitätsabhängige Standardisierung (Yang et al., 2002), um eine inhärente Neigung auf jedem Chip zu kor-
25 rigieren (the lowess scatter-plot smoother). In einem zweiten Schritt wurde eine allgemeine Standardisierung vorgenommen, um die logarithmierten Verhältnisse für jedes Array bei 0 zu zentrieren (um allgemeines Färben und Scanneref- fekte zu berücksichtigen). Da jedes Gen zweimal auf dem Chip 30 aufgetragen wurde, wurden die mittleren logarithmischen

- 21 -

Verhältnisse M aus den Kopien berechnet. Falls die Kopien um mehr als das Vierfache abwichen, oder die Hintergrund-Intensität höher war als die Signalintensität, wurde das Gen von diesem Array ausgeschlossen.

5

Statistische Analyse

Die finale Datenmatrix bestand aus 4608 standardisierten Genexpressionsmessungen (\log_2 -Verhältnisse) aus 94 individuellen Tumoren (mit fehlenden Werten). Um das Expressionsprofil zwischen zwei unabhängigen Gruppen zu vergleichen, wurde eine t-Statistik mit zwei Proben für jedes Gen benutzt. Um ein mehrfaches Testen zu berücksichtigen, berechneten wir die angepaßten p-Werte für jedes Gen, wobei wir einen schrittweise abwärts führenden (step down) Permutations-Algorithmus verwendeten (Westfall und Young, 1993, Algorithmus 4.1). Diese Strategie wurde früher auf Microarrays angewendet (Callow et al., 2000). Der Permutations-Algorithmus liefert eine strenge Kontrolle der familienweisen Fehlerrate (FWER), und berücksichtigt die Korrelation der Variablen (Gene). Das Verfahren verläßt sich nicht auf eine Normalitäts-Annahme; es wird angenommen, daß die t-Statistik für alle Gene asymptotisch die gleiche Nullverteilung besitzt, (oder daß die p-Werte monoton in den beobachteten t-Statistiken über die Gene sind).

25

Cluster Analyse

Vor der Cluster Analyse wurde das Expressionprofil eines jeden Gens durch Subtraktion des mittleren beobachteten Wertes zentriert. Das durchschnittliche, verkettete hierarchische Zusammenfassen zu Clustern (average linkage hierarchical

- 22 -

clustering) wurde dann für Gene sowie für Chips ausgeführt, wobei das euklidische Abstandsmaß wie in den Programm J-Express implementiert, verwendet wurde (Dysvik und Jonassen, 2001).

5

Westernblots, Immun-Präzipitation, Phosphatasebehandlung

Die folgenden Antikörper wurden in Westernblots, Immunfluoreszenz-Experimenten und Immun-Präzipitationen verwendet: α -Fyn: (sc-434); α -cdk2 (sc-163), α -cyclinA (sc-751), alle von 10 Santa Cruz. Neuroblastomgewebe wurde lysiert wie beschrieben (Bergmann et al., 2001).

Für die Phosphatasebehandlung wurden 500 μ g zelluläre Proteine über Nacht bei 4°C mit 5 μ g FYN-Antikörper, der an Protein G Kugelchen gebunden ist, inkubiert. Immunkomplexe 15 wurden entweder mit λ -Proteinphosphatase (NEB) inkubiert, oder mit λ -Proteinphosphatase und Phosphataseinhibitoren. Immunkomplexe wurden mittels einer 10% SDS PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen, und mit einem α -Fyn-Antikörper detektiert.

20

In vitro Kinase-Assays

500 μ g zelluläre Proteine wurden mit 5 μ g α -Fyn-Antikörper, der an Protein G Kugelchen gebunden ist, immunpräzipitiert, gewaschen und in Kinase-Assaypuffer equilibriert, 15 Minuten 25 mit 10 μ Ci γ -ATP (Amersham) und 0,125 mg/ml Enolase inkubiert, mittels einer 10% SDS PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und getrocknet. Die Ergebnisse wurden auf einem Fuji Phosphoimager sichtbar gemacht, und unter Verwendung einer Bildeich-Software quantifiziert.

Chromatin-Immunpräzipitation

Chromatin-Immunpräzipitation wurde wie vorher beschrieben ausgeführt (Bouchard et al., 2001). Zellkerneextrakte

5 (nuclear extracts) wurden über Nacht bei 4°C mit 3 µg α-N-Myc-Antikörper, oder Kontrollantikörper, der an Protein A und Protein G Kugelchen gebunden ist, immunpräzipitiert. Für die PCR-Analyse wurden ein spezifisches Primerpaar für Intron 1 von Prothymosin alpha (als Positivkontrolle), sowie
10 Primerpaare, welche die angegebenen Regionen des MAD2 Genes amplifizieren, verwendet. Primersequenzen sind auf Verlangen erhältlich.

Zellkultur-Experimente

15 SH-SY5Y und IMR-32 Neuroblastom-Zelllinien werden in RPMI 1640 kultiviert, das mit 10% hitze-inaktiviertem FCS ergänzt ist. CMV-gesteuerte Expressionkonstrukte, die für Fyn-Wildtyp (Fynwt) und FynK299M kodieren, sind beschrieben (Wolf et al., 2001). Plasmide, die für AFAPΔLZ und AFAPΔ180-226
20 kodieren, wurden beschrieben (Baisden et al., 2001). Für vorübergehende Transfektionen ließ man die Zellen zunächst auf Deckstreifen 6 Stunden lang wachsen, die mit einer 1:5 Verdünnung von Matrigel (Becton-Dickinson) beschichtet waren. Die Transfektion wurde ausgeführt, indem 5 µg DNA unter
25 Verwendung eines Lipofektin-Reagenz (Invitrogen) eingesetzt wurden. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd nach 60 Stunden fixiert, gewaschen und mit einem monoklonalen α-Fyn-Antikörper (Santa Cruz), oder einem α-AFAP polyklonalem Antikörper aus Kaninchen gefärbt (Baisden et al., 2001).

Literatur

- Baisden., J.M., Qian, Y., Zot, H.M., and Flynn, D.C. (2001).
The actin filament-associated protein AFAP-110 is an adaptor
5 protein that modulates changes in actin filament integrity.
Oncogene 20, 6435-47.
- Bergmann, E., Wanzel, M., Weber, A., Shin, I., Christiansen,
H., and Eilers, M. (2001) Expression of P27(KIP1) is prognostic
10 and independent of MYCN amplification in human neuroblastoma,
Int. J. Cancer 95, 176-83.
- Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M., and Luscher B. (2001). Regulation of
15 cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. Genes Development 15, 2042-7.
- Callow, M.J., Dudoit, S., Gong, E.L., Speed, T.P., and Rubin, E.M. (2000). Microarray expression profiling identifies
20 genes with altered expression in HDL-deficient mice. Genome Research 10, 2022-9.
- Clementi, F., Cabrini, D., Gotti, C., and Sher, E. (1986)
25 Pharmacological characterization of cholinergic receptors in a human neuroblastoma cell line. J. Neurochem 47, 291-7.
- Dysvik, B., and Jonassen, I. (2001) J-Express: exploring
30 gene expression data using Java. Bioinformatics 17, 369-370.
- Hegde, P., Qi, R., Abernathly, K., Gay, C., Dharap, S., Gaspar, R., Hughes, J.E., Snestrud, E., Lee, N., and Quackenbusch, J. (2000). A concise guide to cDNA microarray analysis. Biotechniques 29, 548-50, 552-4, 556 passim.
- Pahlmann, S., Odelstad, L., Larsson, E., Grotte, G., and
35 Nilsson, K., (1981). Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradodecanoyl-phorbol-13-acetate. Int J Cancer 28, 583-9.
- Westfall, P.H., and Young, S.S. (1993) Resampling-Based Multiple Testing. Examples and Methods for p-Value Adjustment.
40

- 25 -

Wolf, R.M., Wilkes, J.J., Chao, M.V., and Resh, M.D.,
(2001). Tyrosine phosphorylation of p190 RhoGAP by Fyn regu-
lates oligodendrocyte differentiation. *J. Neurobiol.* 49, 62-
78.

5

Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Hgai,
J., and Speed, T.P. (2002). Normalization for cDNA micro-
array data: a robust composite method addressing single and
10 multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Research*
30, e15.

Patentansprüche

1. Verwendung von Modulatoren des Signaltransduktionswegs über die Proteinkinase Fyn für die Prophylaxe und/oder Behandlung von Tumorerkrankungen.
5
2. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 1 zur Behandlung von Neuroblastomen.
- 10 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Modulatoren Inhibitoren von Enzymen sind, die direkt oder indirekt durch aktives Fyn inhibiert werden.
- 15 4. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 1 oder 2, die zu einer Erhöhung der Fyn-Aktivität in den Tumorzellen führen.
- 20 5. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Modulatoren Inhibitoren der Proteinkinase CSK sind.
- 25 6. Verwendung von Modulatoren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Modulatoren Inhibitoren der Rho-Kinase sind.
7. Verwendung von Modulatoren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Modulatoren Inhibitoren der MAP-Phosphatase sind.

- 27 -

8. Verwendung von Modulatoren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Modulatoren Aktivatoren der Protein Kinase C sind.

5 9. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 1 oder 2, die den proteolytischen Abbau von Fyn-Kinase in vivo hemmen.

10 10. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 1 oder 2, wo bei die Modulatoren Inhibitoren von Phosphatasen, die Fyn entgegenwirken, sind.

15 11. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 1 oder 2, die zu einer Erhöhung der Signaltransduktion durch Fyn beitragen.

20 12. Verwendung von Modulatoren des Signaltransduktionsweges via Proteinkinase Fyn zur Herstellung eines Medikaments zur Unterdrückung der Metastasenbildung von Tumoren im Frühstadium.

13. Verwendung von Modulatoren nach Anspruch 9, wobei der Tumor ein pädiatrischer oder ein adulter Tumor ist.

25 14. Verwendung von Modulatoren nach einem der vorhergehenden Ansprüche als Bestandteil einer pharmazeutischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung neben dem Modulator als Wirkstoff gegebenenfalls Trägerstoffe und/oder Adjuvantien umfaßt.

15. Verwendung von Modulatoren nach einem der vorhergehen-den Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Modula-tor in Form eines pharmakologisch akzeptablen Salzes, Solvates, Hydrates, oder einer pharmakologisch akzep-tablen Formulierung vorliegt.
5
16. Verwendung von Modulatoren nach einem der vorhergehen-den Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Modula-tor als Prodrug vorliegt, umfassend den Modulator und
10 mindestens eine pharmakologisch akzeptable Schutz-gruppe, die unter physiologischen Bedingungen abge-spalten wird.
17. Verwendung von Modulatoren nach einem der vorhergehen-den Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Modula-tor oral, parenteral, rektal, durch Inhalation, trans-
15 dermal oder intranasal verabreicht wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/08165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|---------------------------------------|
| X | US 5 958 935 A (DAVIS JEREMY MARTIN ET AL) 28 September 1999 (1999-09-28) column 9, line 15-19,29; claims 21,23 --- | 1,3-5, 14,15,17 2,9-13, 16 |
| X | US 5 726 164 A (VAN HOOGEVEST PETER ET AL) 10 March 1998 (1998-03-10) column 1, line 17-37; claim 11 --- | 1,3,4,8, 14,15,17 2,9-13, 16 |
| X | EP 0 657 458 A (LILLY CO ELI) 14 June 1995 (1995-06-14) page 61, paragraph 2; claim 10 --- | 1,3,4,8, 14,15,17 2,9-13, 16 |
| | | -/- |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed Invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

| | |
|---|--|
| Date of the actual completion of the International search | Date of mailing of the International search report |
| 27 November 2003 | 09/12/2003 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Ludwig, G |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/EP 03/08165

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | EP 0 956 865 A (YOSHITOMI PHARMACEUTICAL) 17 November 1999 (1999-11-17) page 31; example 10 claims 49,42 | 1,3,4,6, 14,15,17 |
| Y | --- | 2,9-13, 16 |
| X | US 2002/032148 A1 (ONO TAKASHI ET AL) 14 March 2002 (2002-03-14) | 1,3,4,6, 14,15,17 |
| Y | page 23, last paragraph -page 24, paragraph 1; example 10 claims 8,29 | 2,9-13, 16 |
| X | US 6 147 107 A (DENT PAUL ET AL) 14 November 2000 (2000-11-14) | 1,3,4,7, 14,15,17 |
| Y | claim 13 | 2,9-13, 16 |
| X | US 4 716 179 A (HECKER ERICH ET AL) 29 December 1987 (1987-12-29) page 18, line 6,7 example 5 | 8 |
| | ----- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/EP 03/08165

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|---|------------------|-------------------------|--|------------------|
| US 5958935 | A | 28-09-1999 | AU 7631496 A | | 11-06-1997 |
| | | | DE 69627179 D1 | | 08-05-2003 |
| | | | EP 0862560 A1 | | 09-09-1998 |
| | | | WO 9719065 A1 | | 29-05-1997 |
| | | | US 6235746 B1 | | 22-05-2001 |
| US 5726164 | A | 10-03-1998 | AU 4809496 A | | 03-10-1996 |
| | | | AU 4809596 A | | 03-10-1996 |
| | | | CA 2172110 A1 | | 22-09-1996 |
| | | | CA 2172111 A1 | | 22-09-1996 |
| | | | EP 0733358 A2 | | 25-09-1996 |
| | | | EP 0733372 A2 | | 25-09-1996 |
| | | | HU 9600700 A2 | | 28-02-1997 |
| | | | HU 9600701 A2 | | 28-02-1997 |
| | | | JP 8268915 A | | 15-10-1996 |
| | | | JP 8268893 A | | 15-10-1996 |
| | | | NO 961136 A | | 23-09-1996 |
| | | | NO 961137 A | | 23-09-1996 |
| | | | NZ 286206 A | | 26-05-1997 |
| | | | NZ 286207 A | | 24-04-1997 |
| | | | ZA 9602248 A | | 23-09-1996 |
| | | | ZA 9602249 A | | 23-09-1996 |
| EP 0657458 | A | 14-06-1995 | AT 204579 T | | 15-09-2001 |
| | | | AT 181049 T | | 15-06-1999 |
| | | | AU 687909 B2 | | 05-03-1998 |
| | | | AU 7918894 A | | 15-06-1995 |
| | | | BR 1100596 A3 | | 27-06-2000 |
| | | | BR 9404830 A | | 08-08-1995 |
| | | | BR 9404831 A | | 08-08-1995 |
| | | | CA 2137203 A1 | | 08-06-1995 |
| | | | CA 2137205 A1 | | 08-06-1995 |
| | | | CN 1111247 A ,B | | 08-11-1995 |
| | | | CN 1220266 A ,B | | 23-06-1999 |
| | | | CZ 9403018 A3 | | 14-06-1995 |
| | | | DE 69418978 D1 | | 15-07-1999 |
| | | | DE 69418978 T2 | | 28-10-1999 |
| | | | DE 69428025 D1 | | 27-09-2001 |
| | | | DE 69428025 T2 | | 29-05-2002 |
| | | | DK 657458 T3 | | 29-10-2001 |
| | | | DK 657411 T3 | | 15-11-1999 |
| | | | EP 0657458 A1 | | 14-06-1995 |
| | | | EP 0657411 A1 | | 14-06-1995 |
| | | | ES 2162843 T3 | | 16-01-2002 |
| | | | ES 2134910 T3 | | 16-10-1999 |
| | | | FI 945705 A | | 03-06-1996 |
| | | | FI 945706 A | | 08-06-1995 |
| | | | FI 20000516 A | | 07-03-2000 |
| | | | FI 20011109 A | | 28-05-2001 |
| | | | GR 3030722 T3 | | 30-11-1999 |
| | | | GR 3037087 T3 | | 31-01-2002 |
| | | | HK 1013827 A1 | | 05-07-2002 |
| | | | HU 69164 A2 | | 28-08-1995 |
| | | | HU 71130 A2 | | 28-11-1995 |
| | | | IL 111850 A | | 10-11-2002 |
| | | | IL 111851 A | | 24-09-1998 |
| | | | JP 7215977 A | | 15-08-1995 |
| | | | JP 7238044 A | | 12-09-1995 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/08165

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|--|--|--|
| EP 0657458 | A | NO NZ PL PT RU SG SI SI TW US US US US US | 944643 A 270048 A 306084 A1 657458 T 2147304 C1 63570 A1 657411 T1 657458 T1 425397 B 5541347 A 5624949 A 5614647 A 5552396 A 5674862 A | 08-06-1995 26-11-1996 12-06-1995 28-02-2002 10-04-2000 30-03-1999 31-12-1999 31-12-2001 11-03-2001 30-07-1996 29-04-1997 25-03-1997 03-09-1996 07-10-1997 |
| EP 0956865 | A 17-11-1999 | AU AU BG BG BG BG BR EE EP HU NO NZ PL US CN CZ WO JP KR NZ RU US US | 738620 B2 3785197 A 63991 B1 103246 A 107195 A 63992 B1 9711154 A 9900050 A 0956865 A1 9903694 A2 990622 A 334613 A 331561 A1 6218410 B1 1233188 A 9900460 A3 9806433 A1 2002371014 A 2000029918 A 513800 A 2206321 C2 2003134775 A1 2002032148 A1 | 20-09-2001 06-03-1998 30-09-2003 31-05-2000 30-05-2003 30-09-2003 17-08-1999 16-08-1999 17-11-1999 28-03-2000 12-04-1999 01-02-2002 19-07-1999 17-04-2001 27-10-1999 14-07-1999 19-02-1998 26-12-2002 25-05-2000 28-09-2001 20-06-2003 17-07-2003 14-03-2002 |
| US 2002032148 | A1 14-03-2002 | US AU AU BG BG BG BR CN CZ EE EP HU WO JP KR NO NZ NZ | 2003134775 A1 738620 B2 3785197 A 63991 B1 103246 A 107195 A 63992 B1 9711154 A 1233188 A 9900460 A3 9900050 A 0956865 A1 9903694 A2 9806433 A1 2002371014 A 2000029918 A 990622 A 334613 A 513800 A | 17-07-2003 20-09-2001 06-03-1998 30-09-2003 31-05-2000 30-05-2003 30-09-2003 17-08-1999 27-10-1999 14-07-1999 16-08-1999 17-11-1999 28-03-2000 19-02-1998 26-12-2002 25-05-2000 12-04-1999 01-02-2002 28-09-2001 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/EP 03/08165

| Patent document cited in search report | Publication date | | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|------------|--|--|--|
| US 2002032148 | A1 | | PL 331561 A1 | | 19-07-1999 |
| | | | RU 2206321 C2 | | 20-06-2003 |
| | | | US 6218410 B1 | | 17-04-2001 |
| US 6147107 | A | 14-11-2000 | NONE | | |
| US 4716179 | A | 29-12-1987 | DE 2902506 A1 AT 8203 T AU 529955 B2 AU 5486080 A CA 1160953 A1 DD 150430 A5 DK 26180 A EP 0013983 A2 FI 800171 A IE 50419 B1 JP 55136221 A MC 1298 A NO 800148 A YU 17880 A1 ZA 8000403 A | | 24-07-1980 15-07-1984 30-06-1983 31-07-1980 24-01-1984 02-09-1981 24-07-1980 06-08-1980 24-07-1980 16-04-1986 23-10-1980 03-10-1980 24-07-1980 21-01-1983 28-01-1981 |

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/08165

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K31/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|---------------------------------------|
| X | US 5 958 935 A (DAVIS JEREMY MARTIN ET AL) 28. September 1999 (1999-09-28) Spalte 9, Zeile 15-19,29; Ansprüche 21,23 | 1,3-5, 14,15,17 2,9-13, 16 |
| X | US 5 726 164 A (VAN HOOGEVEST PETER ET AL) 10. März 1998 (1998-03-10) Spalte 1, Zeile 17-37; Anspruch 11 | 1,3,4,8, 14,15,17 2,9-13, 16 |
| X | EP 0 657 458 A (LILLY CO ELI) 14. Juni 1995 (1995-06-14) Seite 61, Absatz 2; Anspruch 10 | 1,3,4,8, 14,15,17 2,9-13, 16 |
| | ----- | -/- |

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

27. November 2003

09/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ludwig, G

INTERNATIONALES
SUCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/08165

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|----------------------|
| X | EP 0 956 865 A (YOSHITOMI PHARMACEUTICAL) 17. November 1999 (1999-11-17) Seite 31; Beispiel 10 Ansprüche 49,42 ---- | 1,3,4,6, 14,15,17 |
| Y | | 2,9-13, 16 |
| X | US 2002/032148 A1 (ONO TAKASHI ET AL) 14. März 2002 (2002-03-14) Seite 23, letzter Absatz -Seite 24, Absatz 1; Beispiel 10 Ansprüche 8,29 ---- | 1,3,4,6, 14,15,17 |
| Y | | 2,9-13, 16 |
| X | US 6 147 107 A (DENT PAUL ET AL) 14. November 2000 (2000-11-14) Anspruch 13 ---- | 1,3,4,7, 14,15,17 |
| Y | | 2,9-13, 16 |
| X | US 4 716 179 A (HECKER ERICH ET AL) 29. Dezember 1987 (1987-12-29) Seite 18, Zeile 6,7 Beispiel 5 ----- | 8 |

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/08165

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | | Mitglied(er) der Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
|---|---|----------------------------|--|--------------------------------|--|----------------------------|
| US 5958935 | A | 28-09-1999 | | AU 7631496 A | | 11-06-1997 |
| | | | | DE 69627179 D1 | | 08-05-2003 |
| | | | | EP 0862560 A1 | | 09-09-1998 |
| | | | | WO 9719065 A1 | | 29-05-1997 |
| | | | | US 6235746 B1 | | 22-05-2001 |
| US 5726164 | A | 10-03-1998 | | AU 4809496 A | | 03-10-1996 |
| | | | | AU 4809596 A | | 03-10-1996 |
| | | | | CA 2172110 A1 | | 22-09-1996 |
| | | | | CA 2172111 A1 | | 22-09-1996 |
| | | | | EP 0733358 A2 | | 25-09-1996 |
| | | | | EP 0733372 A2 | | 25-09-1996 |
| | | | | HU 9600700 A2 | | 28-02-1997 |
| | | | | HU 9600701 A2 | | 28-02-1997 |
| | | | | JP 8268915 A | | 15-10-1996 |
| | | | | JP 8268893 A | | 15-10-1996 |
| | | | | NO 961136 A | | 23-09-1996 |
| | | | | NO 961137 A | | 23-09-1996 |
| | | | | NZ 286206 A | | 26-05-1997 |
| | | | | NZ 286207 A | | 24-04-1997 |
| | | | | ZA 9602248 A | | 23-09-1996 |
| | | | | ZA 9602249 A | | 23-09-1996 |
| EP 0657458 | A | 14-06-1995 | | AT 204579 T | | 15-09-2001 |
| | | | | AT 181049 T | | 15-06-1999 |
| | | | | AU 687909 B2 | | 05-03-1998 |
| | | | | AU 7918894 A | | 15-06-1995 |
| | | | | BR 1100596 A3 | | 27-06-2000 |
| | | | | BR 9404830 A | | 08-08-1995 |
| | | | | BR 9404831 A | | 08-08-1995 |
| | | | | CA 2137203 A1 | | 08-06-1995 |
| | | | | CA 2137205 A1 | | 08-06-1995 |
| | | | | CN 1111247 A ,B | | 08-11-1995 |
| | | | | CN 1220266 A ,B | | 23-06-1999 |
| | | | | CZ 9403018 A3 | | 14-06-1995 |
| | | | | DE 69418978 D1 | | 15-07-1999 |
| | | | | DE 69418978 T2 | | 28-10-1999 |
| | | | | DE 69428025 D1 | | 27-09-2001 |
| | | | | DE 69428025 T2 | | 29-05-2002 |
| | | | | DK 657458 T3 | | 29-10-2001 |
| | | | | DK 657411 T3 | | 15-11-1999 |
| | | | | EP 0657458 A1 | | 14-06-1995 |
| | | | | EP 0657411 A1 | | 14-06-1995 |
| | | | | ES 2162843 T3 | | 16-01-2002 |
| | | | | ES 2134910 T3 | | 16-10-1999 |
| | | | | FI 945705 A | | 03-06-1996 |
| | | | | FI 945706 A | | 08-06-1995 |
| | | | | FI 20000516 A | | 07-03-2000 |
| | | | | FI 20011109 A | | 28-05-2001 |
| | | | | GR 3030722 T3 | | 30-11-1999 |
| | | | | GR 3037087 T3 | | 31-01-2002 |
| | | | | HK 1013827 A1 | | 05-07-2002 |
| | | | | HU 69164 A2 | | 28-08-1995 |
| | | | | HU 71130 A2 | | 28-11-1995 |
| | | | | IL 111850 A | | 10-11-2002 |
| | | | | IL 111851 A | | 24-09-1998 |
| | | | | JP 7215977 A | | 15-08-1995 |
| | | | | JP 7238044 A | | 12-09-1995 |

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 03/08165

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|----------------------------|---|--|
| EP 0657458 | A | NO 944643 A NZ 270048 A PL 306084 A1 PT 657458 T RU 2147304 C1 SG 63570 A1 SI 657411 T1 SI 657458 T1 TW 425397 B US 5541347 A US 5624949 A US 5614647 A US 5552396 A US 5674862 A | 08-06-1995 26-11-1996 12-06-1995 28-02-2002 10-04-2000 30-03-1999 31-12-1999 31-12-2001 11-03-2001 30-07-1996 29-04-1997 25-03-1997 03-09-1996 07-10-1997 |
| EP 0956865 | A 17-11-1999 | AU 738620 B2 AU 3785197 A BG 63991 B1 BG 103246 A BG 107195 A BG 63992 B1 BR 9711154 A EE 9900050 A EP 0956865 A1 HU 9903694 A2 NO 990622 A NZ 334613 A PL 331561 A1 US 6218410 B1 CN 1233188 A CZ 9900460 A3 WO 9806433 A1 JP 2002371014 A KR 2000029918 A NZ 513800 A RU 2206321 C2 US 2003134775 A1 US 2002032148 A1 | 20-09-2001 06-03-1998 30-09-2003 31-05-2000 30-05-2003 30-09-2003 17-08-1999 16-08-1999 17-11-1999 28-03-2000 12-04-1999 01-02-2002 19-07-1999 17-04-2001 27-10-1999 14-07-1999 19-02-1998 26-12-2002 25-05-2000 28-09-2001 20-06-2003 17-07-2003 14-03-2002 |
| US 2002032148 | A1 14-03-2002 | US 2003134775 A1 AU 738620 B2 AU 3785197 A BG 63991 B1 BG 103246 A BG 107195 A BG 63992 B1 BR 9711154 A CN 1233188 A CZ 9900460 A3 EE 9900050 A EP 0956865 A1 HU 9903694 A2 WO 9806433 A1 JP 2002371014 A KR 2000029918 A NO 990622 A NZ 334613 A NZ 513800 A | 17-07-2003 20-09-2001 06-03-1998 30-09-2003 31-05-2000 30-05-2003 30-09-2003 17-08-1999 27-10-1999 14-07-1999 16-08-1999 17-11-1999 28-03-2000 19-02-1998 26-12-2002 25-05-2000 12-04-1999 01-02-2002 28-09-2001 |

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 03/08165

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | | Mitglied(er) der Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
|---|----------------------------|-------|--------------------------------|--|----------------------------|
| US 2002032148 A1 | | | PL 331561 A1 | | 19-07-1999 |
| | | | RU 2206321 C2 | | 20-06-2003 |
| | | | US 6218410 B1 | | 17-04-2001 |
| US 6147107 A | 14-11-2000 | KEINE | | | |
| US 4716179 A | 29-12-1987 | | DE 2902506 A1 | | 24-07-1980 |
| | | | AT 8203 T | | 15-07-1984 |
| | | | AU 529955 B2 | | 30-06-1983 |
| | | | AU 5486080 A | | 31-07-1980 |
| | | | CA 1160953 A1 | | 24-01-1984 |
| | | | DD 150430 A5 | | 02-09-1981 |
| | | | DK 26180 A | | 24-07-1980 |
| | | | EP 0013983 A2 | | 06-08-1980 |
| | | | FI 800171 A | | 24-07-1980 |
| | | | IE 50419 B1 | | 16-04-1986 |
| | | | JP 55136221 A | | 23-10-1980 |
| | | | MC 1298 A | | 03-10-1980 |
| | | | NO 800148 A | | 24-07-1980 |
| | | | YU 17880 A1 | | 21-01-1983 |
| | | | ZA 8000403 A | | 28-01-1981 |